

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790164

研究課題名（和文）PK/PD/PGx 解析に基づく関節リウマチにおける効果的な薬物療法導入法の構築

研究課題名（英文）

Development the efficacious pharmacotherapy based on PK/PD/PGx analyses in patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

林 秀樹 (HIDEKI HAYASHI)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00419665

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ(RA)におけるメトトレキサート(MTX)は、反応性に個人差があり投与量設定の難しい薬剤である。本研究では、MTX 個別化薬物療法実現を目的として、RA 患者における folate pathway の遺伝子多型と赤血球中 MTX および活性体濃度を解析し薬効との関連について検討した。葉酸トランスポーター遺伝子 *RFC1* G80A 多型において G アレルを持つ患者では、生物学的製剤を併用している割合が高かった。MTX 投与量が変更され症状が改善された症例では、赤血球中 MTX ポリグルタメート濃度の増加が認められた。

研究成果の概要（英文）：A patient's responsiveness to methotrexate (MTX) for treating rheumatoid arthritis (RA) has the individual differences. The present study examined genetic polymorphisms related to folate metabolism pathway and concentrations of MTX and its active form, MTX-polyglutamates (MTX-PGs), in red blood cells (RBCs) in RA patients. The patients with the G allele of the G80A polymorphism of the folate transporter gene *RFC1* had less intracellular MTX uptake and therefore had poor efficacy; a greater number of them were found to be biological preparations concomitant cases. The results of the present study suggest the possibility that the *RFC1* G80A polymorphism and MTX-PGs levels in patients' RBCs may be a useful marker for predicting MTX efficacy in Japanese patients with RA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：(1) 薬学 (2) 臨床薬理学 (3) 薬理遺伝学 (4) 薬剤反応性 (5) 医療・福祉 (6) 関節リウマチ (7) メトトレキサート

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)は、多発する関節炎と進行性関節破壊を主症状とする全身性炎症疾患である。RAの発症については現在までに様々な研究が行われているが、発症の決定的な原因や正確な病理生態は未だ不明である。そのためRAに対する治療も根本的なものではなく、免疫系の異常を是正する目的で、葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサート(methotrexate, MTX)をはじめとした免疫抑制機能を有する疾患修飾性抗リウマチ薬(disease modifying anti-rheumatoid drugs, DMARDs)が広く使用されている。

これまでに日本人RA患者において、MTXの抗炎症効果とMTXの標的タンパク質の遺伝子多型や葉酸の取り込みおよび代謝に関わるタンパク質の遺伝子多型との関連について網羅的に調査した研究はほとんどない。本研究では、MTX治療を受けている日本人RA患者における葉酸代謝系に関わるタンパク質の遺伝子多型頻度とMTXの抗炎症効果との関連について検討した。

MTXは主にreduced folate carrier (RFC; SLC19A1)を介して細胞内に取り込まれ、folylpolyglutamate synthaseによってポリグルタミル化されて活性体のMTX-polyglutamates (MTX-PGs)となって薬効を現した後、 $\gamma$ -glutamyl hydrolase (GGH)によって脱ポリグルタミル化されATP-binding cassette (ABC)トランスポーターによって細胞外へと排出される。

RFCは、葉酸の吸収に関与する糖タンパクで、MTXの細胞膜透過においても重要な役割を担っている。MTXはRFCを介し能動輸送メカニズムによって細胞内に入る。RFC遺伝子のエクソン2に存在する80G>A SNPに

より、RFCタンパク質の27番目のアミノ酸であるヒスチジン(His)がアルギニン(Arg)に変異する。このアミノ酸は最初の膜貫通ドメインに存在し、RFCの活性に影響する可能性があると考えられている。

GGHは、細胞内リソソームに存在するペプチド加水分解酵素であり、MTX-PGsをMTXへと変換することによって、細胞内からのMTX排出を促進する。MTXの細胞外への排出には主にABCC1-4およびABCG2が寄与している。GGH遺伝子の-401C>T、-354G>Tの2つのSNPsはいずれもGGHのプロモーター活性を上昇させることによりGGHの発現レベルを上昇させ、MTXのポリグルタメートレベルに影響を与えることが知られている。

MTXは、dihydrofolate reductase (DHFR)を阻害することによって薬効を発現する。生体内において、DHFRは、ジヒドロ葉酸(dihydrofolate, DHF)からテトラヒドロ葉酸(tetrahydrofolate, THF)への還元反応を触媒する酵素で、葉酸サイクルにおいて重要な役割を担っている。2004年、JonsonらによってDHFRのイントロン1に19bp deletionが報告された。この遺伝子多型は、欠損する19bpの塩基配列の中に転写因子Sp1の結合部位が存在するため、DHFRの発現量に影響すると考えられている。また、MTXの標的タンパク質としては、DHFRの他にthymidylate synthase (TS)や5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase (ATIC)の存在が知られている。

TS遺伝子の5'非翻訳領域(5'-untranslated region, 5'-UTR)には、28bpの繰り返し配列多型の存在が知られている。この28bpの塩基はエンハンサーとして働く

ため、繰り返し配列の数が増えると mRNA の発現量が増加することが報告されている。また、3'-非翻訳領域(3'-untranslated region, 3'-UTR)には 6bp deletion の存在が知られている。6bp deletion 型では wild 型に比べて mRNA の安定性が低下し、タンパク質レベルで TS の発現量が低下すると考えられている。

ATIC 遺伝子のエクソン 5 に存在する 347 C>G SNP によって、ATIC タンパク質の 116 番目のアミノ酸であるスレオニン(Thr)がセリン(Ser)に変異する。この SNP が ATIC に及ぼす影響についてはまだ不明瞭な部分が多いが、MTX の治療効果や毒性発現との関連についていくつかの報告がある。

以上のことより、RFC 80G>A、GGH -401C>T、-354G>T は細胞内での MTX の薬物動態学的側面 (pharmacokinetics, PK)を反映し、MTX のターゲット分子 DHFR、TS、ATIC の遺伝子多型である DHFR 19bp deletion、TS 28bp tandem repeat、6bp deletion、ATIC 347C>G は MTX の薬力学的側面 (pharmacodynamics, PD)を反映すると予想される。また、MTX は細胞内でグルタミン酸が連続的に 6 個まで付加され、活性体 MTX-PGs に変換される。MTX-PGs は主要な標的酵素である DHFR を強力に阻害することで葉酸代謝を阻害し免疫細胞の増殖を抑制する。標的細胞であるリンパ球中の MTX-PGs 濃度を測定することは困難だが、RA 患者においては代替的に赤血球の MTX-PGs 濃度と疾患活動性の間に関連があることが示唆されており、赤血球中 MTX-PGs 濃度が治療薬物モニタリングに応用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

RA による関節破壊は、発症早期に急速に進行することが明らかにされており、RA 発症の早期から、強力に炎症・骨破壊を抑制す

ることが重要である。抗がん剤としての歴史が長い MTX は、我が国では、1998 年より RA に対する適応が認められ、MTX の低用量パルス療法が、RA に対して優れた効果を示し、多くの RA 患者に処方されてきた。その反面、我が国の RA 患者において MTX の副作用を否定できない死亡例が多数報告されており、さらに、MTX に対する反応性は、個人差が大きく、期待した薬効が得られなかったり、副作用のため投与中止となったりする症例も少なくない。従って、MTX による治療にあたっては、投与量は患者ごとに調節する必要があるが、そのためには、レベルの高いエビデンスが必要である。本研究は、安全で効果的に MTX を使用するためのエビデンスを構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 関節リウマチ患者

日本人 RA 患者 301 名から文書による同意を得た。それらの患者のうち、2 ヶ月以上 MTX を服用しており、臨床検査値の変化を追跡調査できる 170 名の患者を選択し、本研究の対象とした。170 名の患者のうち、MTX 単独による治療を行っている患者群 (MTX 群)は 89 名、生物学的製剤を併用している患者群 (バイオ製剤併用群)は 81 名であった。MTX の薬効に影響を与えることが知られている免疫抑制剤 (タクロリムス水和物、レフルノミド、ミゾリビン)を併用している患者は除外した。

本研究は、ヘルシンキ宣言および文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、静岡県立大学倫理委員会研究倫理審査部会および JA 静岡厚生病院倫理委員会の審査・承認のもと実施した。すべての被験者に研究の内容を説明し、文書により同意取得を

行った。得られた個人情報、連結可能匿名化を行い管理者が厳重に保管した。

#### 採血およびゲノム DNA 抽出

文書による同意取得後、EDTA-2Na ベノジエクト真空採血管（テルモ）を用いて末梢静脈血 5 mL を採取した。採取した血液検体は、ただちに匿名化を行い、個人情報および血液検体は、別々にして厳重に管理した。−80°C で保存していた血液試料から、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) を用いて、白血球由来のゲノム DNA を抽出し、−20°C で保存した。

#### 遺伝子型解析

*DHFR* 19bp deletion、*TS* 28bp tandem repeat については、PCR 法により解析した。遺伝子型は、PCR 産物のサイズによって決定した。*TS* 6bp deletion、*ATIC* 347G>C は、アレル特異的 PCR 法により解析した。遺伝子型は、各アレル特異的 PCR 産物の有無によって決定した。*RFC* 80G>A の SNP は、PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法により解析した。*GGH* −401C>T および−354G>T の 2 つの SNPs も、PCR-RFLP 法により解析した。

#### 赤血球中 MTX-PGs 濃度測定

−80°C で保存していた RA 患者の赤血球画分 250 μL を過塩素酸で除タンパク処理後 Oasis® HLB 3 cc Extraction Cartridges (Waters, Milford, MA) を用いて固相抽出処理を行った。前処理したサンプルを、極性基によるエンドキャップ処理が施されている分析カラム Synergi Hydro-RP LC 逆相 C18 カラム 50 × 1.00 mm, 4 μm (Phenomenex, Torrance, CA) を用いて高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計にて定量した。

MTX 及び各種 MTX-PGs の赤血球中濃度は、ピーク面積を用いた内部標準法により検量線を作成し、この回帰直線から算出した。

#### 治療効果指標

本研究では、RA の疾患活動性の指標として disease activity score (DAS) 28 を用いた。糖質コルチコイドの投与量については、prednisolone 換算量として算出した。患者情報として年齢、身長、体重、性別、MTX 処方量、治療経過などを診療録より取得した。

#### 統計解析

遺伝子型頻度について、Hardy-Weinberg 平衡式による予測値と実測値の比較および MTX 治療群と生物学的製剤併用治療群の各遺伝子多型の頻度分布の比較には  $\chi^2$  検定を用いた。患者背景における性別の比較は  $\chi^2$  検定を用いて行い、その他の項目についてはマン・ホイットニー検定を用いて行った。多変量解析は、多重ロジスティック回帰分析を行った。有意水準は 5% とし、すべての統計解析は PASW statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL) を使用して行った。

#### 4. 研究成果

#### 患者背景

インフォームドコンセントを取得した RA 患者 301 名のうち、選択基準に合致した 170 名 (MTX 群 89 名、バイオ製剤併用治療群 81 名) を対象とした。

#### 遺伝子多型頻度分布

MTX 治療群 89 名およびバイオ製剤併用治療群 81 名における MTX の標的タンパクにおける遺伝子多型 (*DHFR* 19bp deletion、*TS* 6bp deletion、28bp tandem repeat、*ATIC* 347C>G) を解析した。また、細胞内葉酸代謝

に関わる2つのタンパク質の計3つのSNPs (*RFC80G>A*, *GGH -401C>T*, *-354G>T*) を解析した。両群におけるすべての分布は Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。両群間における遺伝子型の分布を比較したところ、*RFC80G>A* SNP においてのみ有意差が認められた ( $p=0.0139$ )。

#### 多変量解析

単変量解析の結果、両群間で違いが認められた年齢、体重、クレアチニンクリアランス、MTX 投与量、*RFC80G>A* について、多変量解析を実施した。上記5種類の項目を独立変数とし、尤度比による変数増加法を用いた多重ロジスティック回帰分析を行った。結果として、結果、バイオ製剤の併用には年齢と *RFC80G>A* が影響していることが示された (オッズ比 1.082, 2.273)。体重、クレアチニンクリアランスおよび MTX 投与量は p 値が各々 0.4532、0.7516、0.1253 であったため、回帰式には含まれなかった。

#### 疾患活動性と赤血球中 MTX-PGs 濃度との関連

MTX-PGs 濃度を測定した 80 名のうち、MTX 群 32 名を対象に、DAS28 に基づく疾患活動性と、MTX-PGs 濃度の関連を解析した。疾患活動性と MTX-PGs 濃度の関連に統計学的有意差は認められなかったが、疾患活動性の高い群に比べて低い群では 1.23 倍高く、DAS28 の低下に伴い赤血球中 MTX-PGs 濃度が増加する傾向が認められた。また、1 年間の観察期間中に MTX を増量した全症例において、MTX を増量することで DAS28 の値が低下し、赤血球中 MTX-PGs 濃度の上昇が認められた。

#### 考察

本研究では、MTX 群とバイオ製剤併用群において、患者背景、MTX の標的タンパク質遺伝子および葉酸代謝関連タンパク質遺伝子の遺伝子多型が MTX の薬効に与える影響について調査した。MTX 群とバイオ製剤併用群の DAS28 のメジアン値はそれぞれ 2.81 と 2.85 であり、統計学的有意差は無く、両群とも同程度の治療効果が得られていた。これらの患者群に対して多重ロジスティック回帰分析による多変量解析を行った結果、バイオ製剤の併用には年齢と *RFC80G>A* が影響していることが示された。このことから、50 歳代前後で *RFC80GG* を有する患者は、MTX による治療効果が十分に認められず、バイオ製剤の併用に切り替えることによって、MTX 群と同等の治療効果が得られているケースが多いことが示唆された。一方で、体重、クレアチニンクリアランスおよび MTX 投与量は両群に影響を与え得る因子として検出されなかったが、これは年齢に付随する変化量であるためだと考えられた。以上のことから、MTX の薬効が得られにくい、比較的若い *RFC80GG* を有する患者に対しては、早い段階で生物学的製剤の併用を考慮することで、関節炎症の抑制、ならびに関節破壊の抑制効果が期待でき、患者の Quality of Life の改善につながるものと考えられる。*RFC80G>A* SNP により膜貫通ドメインでのアミノ酸変異が起これ、細胞内への MTX の取り込みが促進されると報告されている<sup>11)</sup>。Dervieux らは RA 患者において、*RFC80AA* 遺伝子型の患者では、他の遺伝子型を持つ患者に比べて赤血球中 MTX-PGs レベルが高いことを報告している。さらに、Drozdziak らおよび James らによる臨床研究では、MTX 治療を受け寛解と診断された RA 患者群 (レスポナー群) と MTX 治療による効果が見られなかった患者群 (ノンレスポン

ダー群)における *RFC* 80G>A 遺伝子多型頻度分布を比較した結果、レスポンドー群において *RFC* 80AA 遺伝子型を持つ患者の割合が有意に高かったと報告されている。今回対象とした患者のうち、バイオ製剤を併用している患者は MTX 治療による効果が認められなかったノンレスポンドー群であることが考えられ、このことを考慮すると、今回の研究における結果はこれらの報告と一致すると考えられた。また、統計的有意差は認められなかったが、DAS28 に基づく疾患活動性と赤血中 MTX-PGs 濃度の関連を検討したところ、疾患活動性の高い群に比べて低い群では 1.23 倍高く、DAS28 の低下に伴い赤血球中 MTX-PGs 濃度が増加する傾向が認められた。また、治療中に MTX を増量した 5 症例全てにおいて、MTX を増量することで DAS28 の値が低下し、赤血球中 MTX-PGs 濃度が上昇する症例が認められた。これにより MTX 非応答者でも、MTX を増量することで赤血球中に蓄積する MTX-PGs 濃度が上昇すれば、病態が改善される可能性が示唆された。本研究の結果は、RA 患者の遺伝的背景を考慮した個別化 MTX 投与設計ならびに治療薬物モニタリングを行うことで MTX 療法の最適化に重要な情報を提供するものである。今後、赤血球中 MTX-PGs 濃度モニタリングと遺伝子多型解析の臨床応用に向けた大規模な更なる検討が必要であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Hayashi H, Tazoe Y, Horino M, Fujimaki-Katoh C, Tsuboi S, Matsuyama T, Kosuge K, Yamada H, Tsuji D, Inoue K, Itoh K.: An artifact derived from a pseudogene led to the discovery of

microRNA binding site polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27**, 263-267 (2012)

- 2) 林 秀樹, 伊藤邦彦: 薬効モニタリングの実践-16 関節リウマチ., *薬局*, **62**, 126-131 (2011)
- 3) Hayashi H, Horino M, Morishita M, Tazoe Y, Tsuboi S, Matsuyama T, Kosuge K, Yamada H, Tsuji D, Inoue K, Itoh K.: Dihydrofolate reductase gene intronic 19-bp deletion polymorphisms in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**, 516-518 (2010)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 田添 唯、堀野雅人、林 秀樹、森下茉莉子、坪井声示、松山耐至、小菅和仁、山田 浩、辻 大樹、井上和幸、伊藤邦彦: ジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子多型がメトトレキサートの抗リウマチ効果に及ぼす影響の検討, 日本薬学会第 131 年会 (静岡)、2011 年 3 月 29 日
- 2) 田添 唯、林 秀樹、森下茉莉子、坪井声示、松山耐至、荒井輝久、大鹿雄美、小菅和仁、山田 浩、辻 大樹、井上和幸、伊藤邦彦: 抗リウマチ薬メトトレキサートの効果不十分症例における遺伝的因子の解析, 第 32 回日本臨床薬理学会年会 (浜松)、2011 年 12 月 1 日
- 3) 田添 唯、林 秀樹、森下茉莉子、坪井声示、松山耐至、荒井輝久、大鹿雄美、小菅和仁、山田 浩、辻 大樹、井上和幸、伊藤邦彦: 抗リウマチ薬メトトレキサートの赤血球中濃度と遺伝子多型の関連性の検討, 日本薬学会第 132 年会 (札幌)、2012 年 3 月 31 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 秀樹 (Hideki HAYASHI)

研究者番号: 00419665

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし